

原著

Colored Microsphere によって測定する心拍出量の妥当性とその測定に関する注意点について

河本 美智子* 松田 佳和* 芝本 利重*
林 哲也* 澤野 文俊* 佐伯 由香*
山口 芳裕* 小山 省三*

はじめに

心血管系の生理機能や病態解析さらに心血管系に対する薬物の効果を評価する際に、心拍出量を測定することは重要である。心拍出量は Fick の原理に準じて色素希釈法また最近では温度較差を利用した熱希釈法などで測定されてきており、さらに電気工学的には電磁流量計、超音波流量計などの開発に伴って生理学的、薬理学的、臨床的研究に幅広く利用されてきている^{5,6)}。しかしながら、いずれの測定方法もそれぞれ長所と短所を合わせ持っており、実験計画に対応した適切な測定法を利用する必要がある。多くの臓器（4ないし5以上）の同時血流測定に際しては、多数の電磁流量計や超音波血流計ならびに測定プローブを必要とするのも経済的に実験計画を立てる上で制約を与えている。一方、経時的な心拍出量の測定を必要としないような実験設定や、心拍出量ならびに末梢臓器の組織血流量を同時に測定することを目的とする場合には、従来から放射性同位元素で標識した Microsphere の数を放射性物質の放射線量として計測することによって血流量を算出する Microsphere 法が繁用されてきている^{3,4)}。このような放射性同位元素で標識した Microsphere で血流量を測定する際、経時的に血流量を測定する必要のある実験計画では、半減期の異なった数多くの核種を必要とし、経費的にも、さらに使用前

から使用後の放射性物質の汚染廃棄に関する諸問題によっても実験が制約される。特に大動物（兎以上の動物）に対する放射性同位元素を標識した Microsphere の使用に対してはますます上述した制約が増大する。しかしながら同じ Microsphere 法といえども、放射性同位元素を使用しない新しいタイプの Microsphere が Shell 等によって開発された²⁾。これらの非放射性 Microsphere は Microsphere に異なった色素を付着させることによって識別することが出来る方法である。このような Colored Microsphere で組織血流量を測定することは、放射性同位元素を用いる必要がない点で非常に優れている。一方、放射性同位元素で標識された Microsphere を用いて測定する場合には容易にガイガーシンチレーションカウンターで測定することができる。それに対して Colored Microsphere を用いての測定は血液や組織から Microsphere を抽出するのに煩雑であり、処理回数が多いために誤差が発生し易い欠点がある。このような点より Colored Microsphere を用いて組織血流量を評価した報告がある一方、現在のところ Colored Microsphere 法で心拍出量を測定した成績は見あたらない。本研究では、Colored Microsphere 法でも、電磁流量計での心拍出量と近似した測定値を得ることができていることを、犬の実験で確認できたのでその測定法の注意点とともに報告する。

Key words : 心拍出量, 色付マイクロソフェア

*信州大学医学部第2生理教室

方 法

雑種成犬 (約 10 kg) にPentobarbital (25 mg/kg) を静脈内に投与して麻酔状態を得た。気管内に気管チューブを挿入固定し人工呼吸器に接続した。Gallamine triethiodide (2 mg/kg) を静脈内投与し筋弛緩を行ったのち調節呼吸とした。次いで大腿動脈にカテーテルを挿入し、圧カトランスデューサーに接続して体血圧を測定した。さらに各薬物の投与のために、大腿静脈にカテーテルを挿入した。また右鎖骨下動脈より上行大動脈内にカテーテルを挿入した。なお実験終了後に、カテーテル先端が正しく上行大動脈にあるのを確認した。このカテーテルは動脈血液の採取のために用いた。その後、第8肋間で左開胸し、心拍出量の変化を誘発させるために下大静脈周囲に体外から血管を閉塞するためのループを装着し、胸腔外に導出したのち閉胸した。さらに第3肋間で開胸し Colored Microsphere を投与するために、左心房内にカテーテルを挿入留置した。また、電磁血流計のプロープを上行大動脈に装着留置した。Polyethylene Colored Microsphere は E-Z TRAC 社 (Los Angeles, California) から入手した。実験には赤、青、緑、黒、黄色の5種類の Colored Microsphere で検討した。この Microsphere の大きさは $12 \pm 1.1 \mu\text{m}$ である。入手した Microsphere は1%の水分を含んだフメロゾールで溶解されており、1バイアルに約 $2 \times 10^8/\text{ml}$ を含んでいる。この溶解液中の Microsphere の量をより正確に把握するために、バイアル入手後血球計数盤で再計測した。Microsphere の投与量については通常多くの Microsphere が投与されればされるほど測定誤差率は小さくなる一方、この Colored Microsphere が高価であるために経済性が問題となる。また多量の Microsphere を使えば精度は上がる一方、末梢血管での塞栓を起こす可能性もあり、結果として臓器虚血を起こす可能性もある。また、量が少なければ少ないほど繰り返して Microsphere を投与することが可能であるが、量を少なくすると最終的に回収した Microsphere の数のわずかな差が大きな誤差を生ずる。この相矛盾する点を考慮した上で5種類の Microsphere を使用した今回の実験では、バイアルから採取する予想最適

投与量を体重 1 kg あたり 30×10^4 個の Microsphere とした。それぞれの色の Microsphere を含むバイアルを1分間ボルテックスで混和し、体重 1 kg 当り約 30×10^4 個 (予想投与量: Em) の Microsphere をプラスチック容器に入れた。Microsphere を投与する前に、Microsphere の原液の入っているバイアルをあらかじめボルテックスで混和したといえども、Microsphere が溶液に比べて重い均一な量を採取分注することが困難である。そのため、バイアルから採取した Microsphere を実験直前にさらに血球計算盤で実際の投与個数 (To) の再計測を行った。また実験に使用した注射針や注射器の中に残留している Microsphere が、その後の血流量を計算する際に大きな誤差を与えることが予想される。したがってこれらの注射器ならびに注射針を蒸留水で洗浄し、この洗浄液中の Microsphere 数 (Tr) の計測を行い、動物に実際に投与された Microsphere 量 ($T = To - Tr$) を求めた。心拍出量を変化させるために下大静脈をループで閉塞した。また上行大動脈に装着した電磁流量計プロープならびに電磁流量計 (日本光電) で心拍出量を測定した。左心房に留置したカテーテルを介して、注射器内の Microsphere を心拍に同期して2~3心拍以内で急速に投与した。Microsphere を計測するための血液サンプルの採取には、すでに鎖骨下動脈に挿入しているカテーテルを介して、Truth 万能注入器 A-II で採取した。採取の条件は、Microsphere の投与開始の1秒前から採取を開始し、投与後10秒間にわたって $30.6 \text{ ml}/\text{min}$ の一定速度 (Vt) で血液採取を行った (カテーテルの死腔があるため実際の Microsphere の存在する血液の採血時間は9秒間である)。採取した血液 (約 5 ml) は EDTA Na_2 (エチレンジアミン4酢酸ナトリウム) 1.5 mg に対して血液 1 ml の割合でプラスチックチューブ内で混合した後、その内の 2.0 ml を30分間遠沈 (3000 rpm) をした。その後、先端に注射針を付けたアスピレーターで血漿成分を注意深く除去し、血球沈査物を 8-10 ml の『血液溶解試薬 (E-Z TRAC 製)』で希釈、混和後30分間の遠沈 (3000 rpm) を行なった。上清を捨てたのち沈査に 8-10 ml の蒸留水を加えた。次いで再び混和し15分間遠沈を行い、さらにこの上清を除去した。

この沈査に『組織・血液分解試薬 I (E-Z TRAC 製)』(強アルカリ試薬)を加えた後、煮沸器の中で15分間にわたって70-80度で加温処理し、室温で放冷した後、8-10 ml の蒸留水を加えてさらに15分間の遠沈操作を行った。この上清を除去し、沈査に『血液マイクロソフェア計測用試薬 (E-Z TRAC製)』7-8 ml を加えてボルテックスで混和した。再び15分間遠沈を行ない上清を前述の方法で注意深く取り去った。この沈査を混和したのち、残留している Microsphere の数を計測した。この計測の際、沈査の全容量が一定でないためにすべての Microsphere を含む溶液量に『血液マイクロソフェア計測用試薬 (E-Z TRAC 製)』を加えて、全体を 100 μl とした。測定した容量は Microsphere の最終的に希釈された容量となる。最終的な Microsphere を含んだ溶液は、Türk の血球計算盤を用いてそれぞれの試料に対して計算盤の4区域を計測した。この計測を少なくとも2回以上繰り返しその平均値を計算に用いた。なお、これらの操作手順を図1に示した。

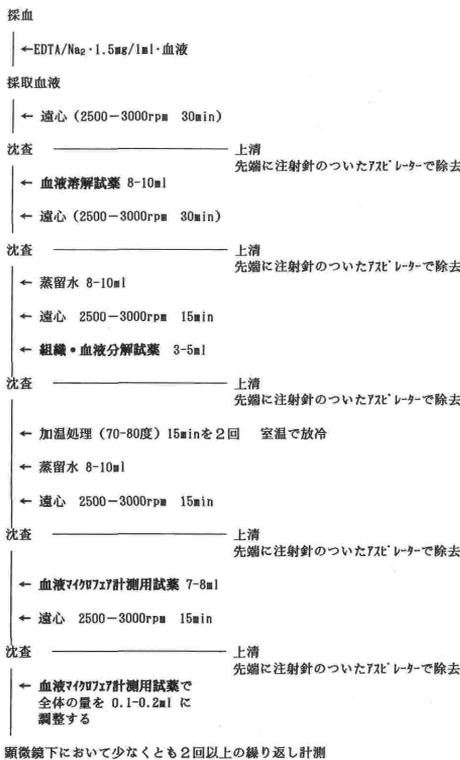


図1 Microsphere の抽出手順

心拍出量の計算

心拍出量 (Q) は Fick の原理から次の3変数、すなわち1) 血液採取速度 (V), 2) 全採取血液中の総 Microsphere 数 (C), 3) 実際に投与した Microsphere 数 (T) により次式から求まる。

$$Q = T \times V / C \quad \dots\dots 1)$$

実際に投与した Microsphere の数 (T) は投与前に用意した Microsphere の数 (To) から、投与後注射器内に残留した Microsphere 数 (Tr) の差より求める。すなわち、

$$T = T_o - T_r \quad \dots\dots 2)$$

また、採取した Microsphere の総数 (C) は実測した Türk 盤1区域の Microsphere 数 (Cm) より $C = C_m \times 10^4$ としてもとまる。

採血スピード、V (ml/min) は10秒間に採血された血液量 Vo (ml) より $V = 6 \times V_o$ としてもとまる。

従って心拍出量 Q は

$$Q = (T_o - T_r) \times 6 \times V_o / C_m \times 10^4 \quad \dots\dots 3)$$

このようにして求める心拍出量の算出過程において誤り易い点として次の2つの可能性が考えられる。

1) 投与する Microsphere 数 (T) に関連する点。

この誤りは、T を実測しないで、購入時の1バイアル中の Microsphere 濃度を 2×10^8 個/ml と考えそれに基づいて体重 1kg 当り 30×10^4 個として $T = 30 \times 10^4 \times B_w$ としてしまう誤りである。ただし、Bw は体重。

2) また、もうひとつの誤差の発生する可能性として、血液採取速度に関連したものである。Truth 万能注入器を使用して採血しているが、注射器によっては、特にプラスチック製の注射器を使う場合、実際の注射器のシリンダーの抵抗が異なっており実際の採血量は一定でないことが起こる。そのために予測採血速度の 30.6 ml/min の一定速度 (Vt) では正確な血液採取ができない場合があることである。そのため正確な採血スピードは実測して得られた採血量を採血に要した時間で除することにより求めなければならない。この点を無視して盲目的に $V = 30.6$ ml/min としてしまうことである。

以上の2点の誤りに基づいて算出される心拍出

量 Q は、次式のようになる。

$$Q = ExV/C$$

$$= (30 \times 10^4 \times Bwx30.6) / (Cmx10^4) \quad \dots\dots 4)$$

本研究では 3) 式で求める正確な心拍出量の値と 4) 式より求める誤った心拍出量の値を比較検討するとともに、それぞれの時点で計測した電磁流量計での心拍出量の値とで直線相関、多項式相関、対数相関ならびに指数相関に最適する相関係数を求めた。

結 果

Colored Microsphere 法と電磁血流計で測定した心拍出量との相関分散図、ならびにその直線回帰曲線を図 2 に示した。直線回帰においては、求める 3) と 4) の式で求めた心拍出量は電磁流量計の値と相関係数 0.749 と 0.728 であり、統計学的に有意な直線相関を示した (図 2)。しかしながら、この直線相関係数の最も良好な場合は 3) 式で求めた相関係数 ($r^2=0.749$) が良い相関を示した。しかし、心拍出量が 600 ml/min 以上の場合には時に大きな差が出ることがあった。同じよう

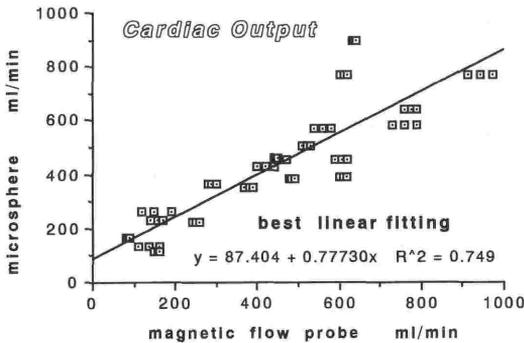


図 2 直線回帰させた際の散布図と直線相関式

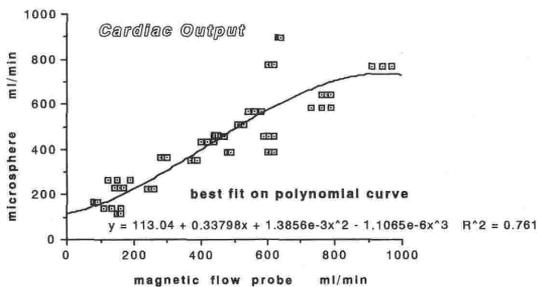


図 3 多項式回帰させた際の散布図と多項相関式

な成績を多項式に回帰させると 3) と 4) 式で求めた心拍出量と電磁流量計での相関係数は 0.761 と 0.735 であり 3) 式で最も良い相関を示した (図 3)。さらに対数曲線に回帰させた場合は 3) と 4) 式の心拍出量の相関係数は 0.709 と 0.681 であり、この際も 3) 式で計算した方が良い相関係数を示した (図 4)。さらに指数曲線に最適回帰させた場合には 3) と 4) 式で求めた心拍出量からの相関係数は 0.771 と 0.781 であり、この場合は 3) 式に比べて 4) 式で良い相関係数が得られた (図 5)。

考 察

本研究では、従来から組織血流量の検討のために用いられている Colored Microsphere で心拍出量を測定することを試み、処理の改善、処理の注意深さ、方法で述べた処理の要点を厳重に守ることにより、電磁流量計で測定した心拍出量とき

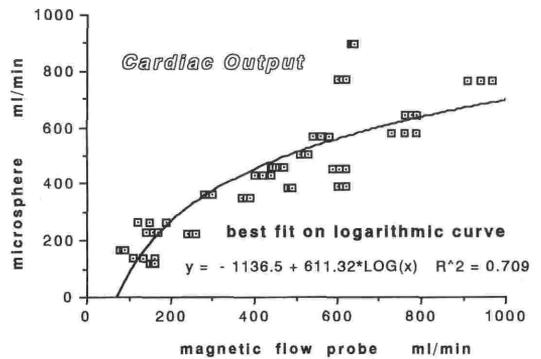


図 4 対数回帰させた際の散布図と対数相関式

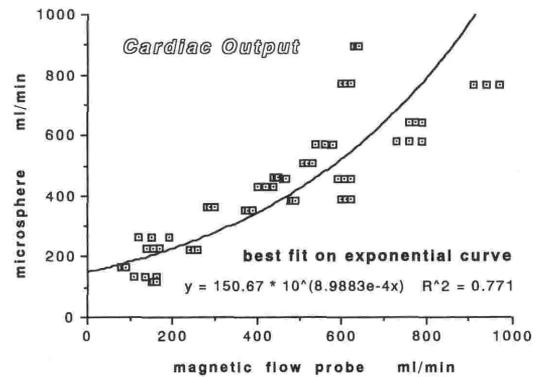


図 5 指数回帰させた際の散布図と指数相関式

わめて高い相関関係があることを示した。また実際に投与された Microsphere の数、実際の採血量などを補正して心拍出量を求めることが大切であることを示した。

Colored Microsphere 法を用いることによって放射性汚染または実験終了後の放射性廃棄物の処理の煩雑さを避けるとともに、環境汚染を回避することが出来る。また、非観血的に Colored Microsphere を用いても心拍出量を測定することが可能であることを示した。心拍出量の測定では前述したように Colored Microsphere は他の測定法に比べて多くの利点を持っている。一方、本法は図1で示したようにきわめて煩雑で、さらに注意深い操作が必要であり、この点が欠点でもある。しかし、この煩雑さを回避し慎重な計測操作が行われるとすれば、電磁流量計を用いるのと同様な心拍出量が計測され、さらに同時に全身各臓器の血流量を測定することが可能である。

Microsphere を用いて心拍出量を求めることは従来から知られている。Lundberg 等⁷⁾は酸素消費量と動静脈酸素較差で求めた心拍出量と放射性同位元素で標識した Microsphere で求めた心拍出量では低流量状態においても直線相関のあることを示している。しかしながら、本研究では約 600 ml/min/kg 以上さらに約 100 ml/min/kg 以下の低心拍出量状態においては誤差が大きくなることを示した。これは心拍出量を算出するにあたって Fick の原理に基づいた Colored Microsphere の血管内分布や採取のタイミングさらに採血スピードなどが関係していると思われる。指数曲線上に回帰させた場合に誤差の大きくなる可能性のある4)式での相関係数が3)式に比べて良くなったのもこの点に原因していると思われる。また本研究では投与前の Colored Microsphere の数量と投与後の残留分を正確に計測することによって電磁流量計で測定した心拍出量との間に高い相関性が得られることを示した。このような Colred Microsphere で心拍出量を検討する試みは現在までなかった。

また、同時に末梢の組織血流量の測定に関しては従来から Microsphere を利用した多くの成績が報告されてきている。Colored Microsphere を使用して心筋の血流量を測定した Hale ら¹⁾の報告では、Colored Microsphere で測定した心筋血

流量は、放射性同位元素で標識した Microsphere で測定した心筋血流量と相関係数0.97の相関を示すことを示している。また、Colored Microsphere で測定した組織血流量は、一般的に放射性同位元素を標識した Microsphere で測定した心筋血流量に比較して、正常状態では Colored Microsphere での血流量が8%程度多めの血流量を示すことを指摘している。また血流量が0~2 ml/min/g の低流量の状態では、Colored Microsphere での血流量は8%高い値を示し、血流量を薬物的に増加(2~7.5 ml/min/g)させたような場合には、Colored Microsphere での局所血流量は放射性同位元素を標識した Microsphere で測定した値よりも39%高い値を示すことを報告している。このことは、Colored Microsphere で測定した血流量は高流量や低流量状態で誤差が大きくなることを示している。本研究では心拍出量の測定が Colored Microsphere で可能か否かを検討したが、Colored Microsphere での心拍出量は電磁流量計で求めた心拍出量よりも多めの値を示した。Hale ら¹⁾が報告した組織血流量の誤差率の成績と一致するものと推察される。

低流量状態や高流量状態で誤差が大きくなる点に関しては、多分 Microsphere によって流量を計測する場合、採血スピード{1)式V}の要因が大きく関与していると思われる。すなわち流量が低い場合には投与した microsphere が心房内から心室内に滞っており、設定した採血時間内に正確に Microsphere が採取できない。また、高流量状態では血管内に残留している量が単位時間当たり少なくなり、採取できる Microsphere 数が少なくなる。設定した採血スピードが遅すぎて正確に microsphere を採取できない可能性が考えられる。高流量や低流量状態においては採血スピードの適切な設定が必要と思われる。今後流量の多い場合の補正式の導入または、採血時間ならびに採血スピードの改善をする必要があると思われる。

ま と め

Colored Microsphere での測定は煩雑さをともなっている点が問題である一方、その処置を注意深く行うことによって、電磁流量計や放射性物質で標識された Microsphere などでの心拍出量の

測定法と同じように心拍出量を求めることができ、実験計画に対応した測定法の選択が広がるものと思われる。心血管系の生理学的さらに薬理学的な研究、また、虚血臓器などの病態生理の解明に Colored Microsphere の利用が進むものと思われる。

文 献

- 1) Hale, S. L., Alker, K. J. and Kloner, R. A.: Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation*, 78: 428-434, 1988.
- 2) Shall, W. E., Kjekshus, J. K. and Sobel, R. E.: Quantitative assessment of the extent of myocardial infarction in the conscious dog by means of analysis of serial changes in serum creatine phosphokinase activity. *J. Clin. Invest.* 50: 2614-2625, 1971.
- 3) Domenech, R. J., Hoffman, J. I. E., Noble, M. I. M., et. al.: Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microsphere in conscious and anesthetized dogs. *Circ. Res.*, 25: 581-596, 1969.
- 4) Heymann, M. A., Payne, B. D., Hoffman, J. I. E., et. al.: Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog. Cardiovas. Dis.* 20: 55-79, 1977.
- 5) 栗田 明, Ganz, W.: 熱希釈法による局所冠状静脈流出量の測定法, 殊に冠動脈流入量との関係. *心臓* 15: 526-532, 1983.
- 6) Koyama, S.: Characteristic Cardiovascular effects of RA642, pyrimido-pyrimidine derivative, in anesthetized dogs. *J. Exp. Pharmacol. Ther.* 233: 480-484, 1985.
- 7) Lundbeag, C. and Schoenberg, M. H.: Comparison of the Fick principle and the radioactive microsphere method in measuring cardiac output during haemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand*: 123: 293-297, 1985.

Pitfall of measurements of cardiac output used by colored microspheres

Michiko Kawamoto, Yoshikazu Matsuda, Toshishige Shibamoto,
Tetsuya Hayashi, Fumitoshi Sawano, Yuka Saeki,
Yoshihiro Yamaguchi, and Shozo Koyama

Department of Physiology, Division 2, Shinshu University School of Medicine,
Asahi, Matsumoto, Nagano 390, Japan

Evaluation of cardiac output is important to understand cardiovascular responses on various experimental protocols. Several methods to measure cardiac output have been established; magnetic flow meter, ultrasonic flow meter, laser flow meter, thermodilution method, radiolabeled microsphere and so on. However, all of the methods have some difficulties to be applied to experimental protocols. In this study, we determined a capability of application of colored microsphere method to measurement of cardiac output, compared with magnetic flow meter. We showed an acceptable result to measure cardiac output by use of colored

microsphere. The correlation coefficient between cardiac output measured by magnetic flow meter and by colored microsphere was statistically significant. However, when calculation of cardiac output was corrected by some factors, correlation coefficient become improved. These factors were sampling time, sampling volume, dead space of the tube, reevaluation of numbers of microspheres before the injection and determination of the numbers of microspheres remained in the syringe. Data seemed to best fit on an exponential curve rather than linear, logarithmic and polynomial curves.